

## ⑫ 公開特許公報(A) 平1-181799

⑤ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 平成1年(1989)7月19日

C 12 Q 1/40

6807-4B

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全5頁)

⑭ 発明の名称 塩素イオン定量用試薬

⑰ 特 願 昭63-5495

⑱ 出 願 昭63(1988)1月13日

⑲ 発 明 者 高 瀬 潤 子 茨城県勝田市市毛882番地 株式会社日立製作所那珂工場内

⑲ 発 明 者 三 巻 弘 茨城県勝田市市毛882番地 株式会社日立製作所那珂工場内

⑲ 発 明 者 高 畑 藤 也 茨城県勝田市市毛882番地 株式会社日立製作所那珂工場内

⑳ 出 願 人 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地

㉑ 代 理 人 弁理士 鶴 沼 辰 之 外1名

## 明 細 容

## 1. 発明の名称

塩素イオン定量用試薬

## 2. 特許請求の範囲

(1) カルシウムイオンと錯体を形成する錯体形成試薬と、アミラーゼと、カルシウムイオンと、を備えた塩素イオン定量用試薬であって、重硝酸イオンおよび硝酸イオンを分解する試薬が含有されてなることを特徴とする塩素イオン定量用試薬。

(2) 特許請求の範囲第1項において、前記重硝酸イオンおよび硝酸イオンを分解する試薬が、硝酸レダクターゼ、重硝酸レダクターゼであることを特徴とする塩素イオン定量用試薬。

(3) 特許請求の範囲第1項において、前記錯体形成試薬はEDTAであることを特徴とする塩素イオン定量用試薬。

(4) 特許請求の範囲第1項～第3項のいずれか1項において、前記アミラーゼは哺乳類由来の $\alpha$ -アミラーゼであることを特徴とする塩素イオン定量用試薬。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、酵素法による塩素イオンの定量用試薬に係り、特に共存する妨害イオンの影響を回避した塩素イオン定量用試薬に関する。

(従来の技術)

生体試料、例えば血清、尿、髄液中のイオンの定量法として、現在、電位滴定および電極法が適用されている。しかし、電位滴定法は生化学自動分析装置への組み込みが困難であり、電極法はイオン特異性の点で問題がある。そこで、次のような酵素法が存在する。

この酵素法は、例えばEur. J. Biochem. 41, P 171-180 (1974)、で示されるように、哺乳類由来のアミラーゼと、カルシウムイオンとの親和性が塩素イオンにより変化する性質を利用した方法である。酵素法による塩素イオンの測定原理は、次のようである。

塩素イオン非存在下にブタすい臓の $\alpha$ -アミラーゼを、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)等

のカルシウムイオンと錯体を形成する錯体形成試薬（カルシウムキレート）および微量のカルシウムイオン共存させると、ブタスイロ $\alpha$ -アミラーゼは分子内カルシウムイオンを放出して、非活性の $\alpha$ -アミラーゼに変化する。本状態に、血清等の試料を添加すると、試料中の塩素イオン濃度に応じて、非活性アミラーゼがカルシウムイオンと再結合して、活性型に変化する。変化した活性型の $\alpha$ -アミラーゼを、 $\alpha$ -アミラーゼ活性測定用試薬で測定し、塩素イオン濃度に換算する。

この酵素法は、冠極法に比べイオン特異性が高く、生化学自動分析装置への適用も可能な測定法にある。次の第1表に、冠極法と酵素法のイオンの特異性を、塩素イオンに対する感度を100%として示す。

第 1 表

	酵素法	冠極法
C $\beta$ <sup>H</sup>	100	100
NO $\beta$ <sup>H</sup>	10.3	—
NO $\beta$ <sup>H</sup>	9.8	140

ウムイオンと錯体を形成する錯体形成試薬と、アミラーゼと、カルシウムイオンと、を備えた塩素イオン定量用試薬であって、亜硝酸イオンおよび硝酸イオンを分解する試薬が含有されてなることを特徴とする塩素イオン定量用試薬である。

上記本発明において、カルシウムイオンと錯体を形成する錯体形成試薬としては、例えば、エチレンジアミン四酢酸、トランス-1, 2-シクロヘキサジアミン-N, N, N, N'-テトラ酢酸、グリコールエーテルジアミン四酢酸、イミノ四酢酸、ジアミノプロパン四酢酸などが用いられる。

また、アミラーゼ活性測定用試薬としては、通常の $\alpha$ -アミラーゼ活性測定法において公知慣用の試薬である。例えば、4-ニトロフェニル $\alpha$ -D-アルトペンタオシド、2-クロル-4-ニトロフェニル $\beta$ -D-マルトペンタオシド、2-クロル-4-ニトロフェニル $\beta$ -D-マルトヘプタオシドなどがある。

アミラーゼとしては、各種アミラーゼ、例えば

上記第1表に示されるように、酵素法では冠極法に比べイオン特異性が優れていることがわかる。

〔発明が解決しようとする問題点〕

上記従来の酵素法では、亜硝酸イオンと硝酸イオンの影響の回避についての配慮がなされておらず、選択性の面で問題が残されていた。すなわち、本発明者らが偶意検討したところ、亜硝酸イオンおよび硝酸イオンが存在すると、イオン特異性が劣化することを見出した。すなわち、前記第1表からわかるように、亜硝酸イオンで10.3%、硝酸イオンで9.8%の値を示しており、これらのイオンの影響を回避する配慮がなされていないことがわかった。

本発明は、かかる問題点を解決するために、硝酸イオン、亜硝酸イオンの影響を回避したイオン特異性の高い塩素イオン定量用試薬を提供することを目的とする。

〔問題点を解決するための手段〕

上記目的を達成するために、本発明は、カルシ

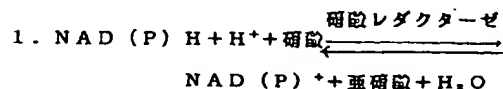
$\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ等を用いることができる。

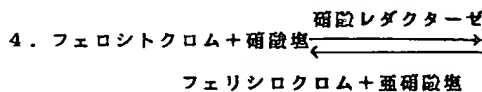
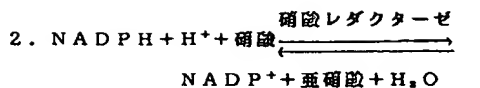
また、本発明において、硝酸イオンおよび亜硝酸イオンを分解する物質としては、例えば硝酸レダクターゼ、亜硝酸レダクターゼ等の酵素を用いることができる。この他に、無機、有機の各種の分解物質を用いることもできる。酵素を用いて亜硝酸イオンおよび硝酸イオンを分解する場合には、基質特異性があり、他のイオンに影響を与えないという利点が存在する。

〔実施例〕

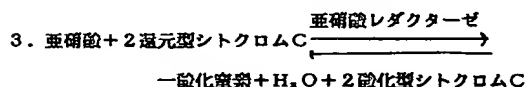
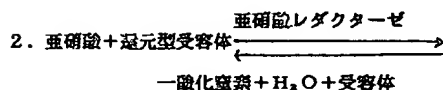
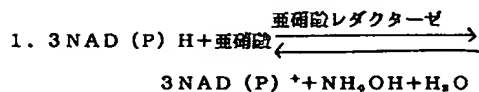
本実施例は、試料溶液中、例えば血清試料に含まれている硝酸イオン、亜硝酸イオンを酵素によって分解する。硝酸イオンを分解するものとしては硝酸レダクターゼであり、亜硝酸イオンを分解する酵素は亜硝酸レダクターゼである。

硝酸レダクターゼと硝酸との酵素反応を以下に示す。





一方、亜硝酸レダクターゼと亜硝酸との反応を次に示す。



本実施例では、上記酵素反応を利用して亜硝酸イオンおよび硝酸イオンを分解することができる。

ーゼ200U、NAD(P)H0.6mMを加え、第1試薬とした。

#### (2) 第2試薬

第2試薬の組成は次のものからなる。

2-クロル-4-ニトロフェニル-β-D-マルトヘptaオシド1.0gを、前記第1試薬で説明した溶液A100mlに溶解し、第2試薬とした。

次に、塩素イオン測定について説明する。

#### (3) キャリブレーション

標準溶液として、0, 40, 80, 120, 160, 200mMの各食塩水を用意した。それぞれ、6μlに対し、第1試薬320μl、第2試薬80μlを加え、37℃で主波長405nm、副波長480nmにおける経時的な吸光度の上昇を、日立7150型自動分析装置で測定し、キャリブレーションを行った。

経時的な吸光度の上昇は、塩素イオンの濃度に比例して生じる。

第1図に、自動分析装置の操作手順を示す。

本実施例に係る試薬を用いての塩素イオンの測

次に、本発明に係る塩素イオン定量用試薬の具体的な組成について説明する。

本例では、塩素イオン定量時の妨害成分となる硝酸イオン、亜硝酸イオンを分解するために、硝酸レダクターゼ、亜硝酸レダクターゼおよびNAD(P)Hを使用した。また、α-グルコシダーゼ、β-グルコシダーゼおよびユークロル-4-ニトロフェニル-β-D-マルトヘptaオシドも使用した。試薬は第1試薬と第2試薬から形成される。

#### (1) 第1試薬

第1試薬は次の組成からなる。

エチレンジアミン四酢酸カルシウム15mgおよびエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム1.1gを0.1Mリン酸緩衝液100mlに加え、5%水酸化ナトリウム水溶液を用いてpHを7.0に調整した。この溶液を溶液Aとする。その後、α-グルコシダーゼ11K単位(U)、β-グルコシダーゼ300U、ブタスイロα-アミラーゼ2KU、硝酸レダクターゼ200U、亜硝酸レダク

定は、第1図で示された工程に従って行われる。

第1図に示すように、サンプル分注後、第1試薬を添加、攪拌し、微分間反応させたのち、第2試薬を添加、攪拌し、さらに反応させる。第1試薬添加後から測定終了までの間の反応液の吸光度を、微10秒間隔で測定し、分析法に応じたタイミングの吸光度を用いて、塩素イオンの定量を行う。

#### (4) 硝酸イオン添加による影響

試料としてコントロール血清に硝酸ナトリウム溶液を添加した溶液を用いた。コントロール血清は、指定量の半量の蒸留水で溶解した。これを溶液Bとする。硝酸ナトリウム1.7gを100mlの蒸留水で溶解し、200mM硝酸イオンを調整した。これを溶液Cとする。溶液Cを適宜希釈し、40, 80, 120, 160, 200mM硝酸ナトリウム溶液を調整し、それぞれを溶液Bと1:1の割合で混合した。このときの塩素イオンの定量結果を、従来試薬((1)の第1試薬より硝酸レダクターゼ、亜硝酸レダクターゼ、NAD(P)

Hを除去了もの、第2試薬は(2)と同じ)での  
定量結果と共に、第2図に示す。第2図に示すよ  
うに、従来法では、試料中の硝酸イオンの濃度が  
高濃度になると、塩素イオンの定量結果も高く測  
定されていたが、本法によれば、硝酸イオンの影  
響が完全に回避できた。

#### (5) 亜硝酸イオン添加による影響

亜硝酸ナトリウム0.38gを100mlの蒸留  
水で溶解し、200mM亜硝酸イオン溶液を調製  
した。(4)と同様に試料を調製し、本法と従来法  
で塩素イオンを定量した。その結果を第3図に示  
す。(4)と同様、本法によれば、亜硝酸イオン影  
響が完全に回避できた。

本発明の塩素イオン定量用試薬により定量可能  
な塩素イオンの濃度は、試料中の濃度として約1  
0mM~3000mMである。この濃度範囲は、  
通常血清中の塩素濃度を測定する際に必要な範囲  
である70~130mMを十分に担保することができる。  
本発明試薬によれば、血液中の塩素イオン濃度を  
十分定量することができる。

オン、亜硝酸イオンを分解できるので、硝酸イオン、  
および亜硝酸イオンの影響を回避したイオン  
特異性の高い塩素イオン定量用試薬を提供するこ  
とができる。したがって、より正確な塩素イオン  
の定量を行うことができる。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、自動分析装置の測定手順の工程図、  
第2図は硝酸イオン添加による塩素イオン測定値  
の影響を示すグラフ、第3図は亜硝酸イオン添加  
による塩素イオン測定値の影響を示すグラフである。

代理人 鶴 沼 展 之

本発明に係る塩素イオン定量用試薬における試  
薬の各成分の許容濃度範囲を次に示す。

第1試薬については、次のとおりである。

$\alpha$ -グルコシダーゼ80~110KU/l、 $\beta$ -  
グルコシダーゼ2.5~3KU/l、 $\alpha$ -アミ  
ラーゼ2~20KU/l、 $Ca^{+}0.75\sim1.5$   
mM/l、EDTA30~100mM/l、リン  
酸緩衝液pH7.0、0.1M/l、硝酸レダク  
ターゼ2~20KU/l、亜硝酸レダクターゼ2~  
20KU/l、NAD(P)H6~60mM/l。

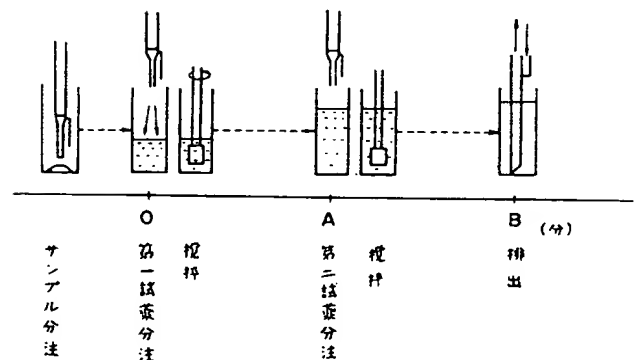
第2試薬の成分の含有量としては、例えば次の  
とおりである。 $Ca^{+}0.75\sim1.5$ mM/l、  
EDTA30~100mM/l、2-クロル-4  
ニトロフェニル- $\beta$ -D-マルトヘプタオシド  
3.8~7.5mM/l。

なお、2-クロル-4-ニトロフェニル- $\beta$ -  
D-マルトヘプタオシドの代わりに、マルトペン  
タオース2.5%を用いることもできる。

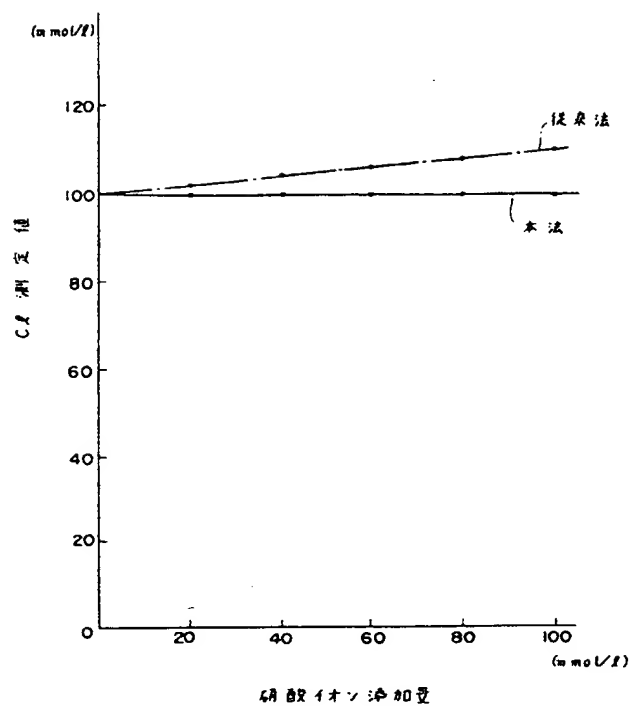
#### 〔発明の効果〕

以上説明したように、本発明によれば、硝酸イ

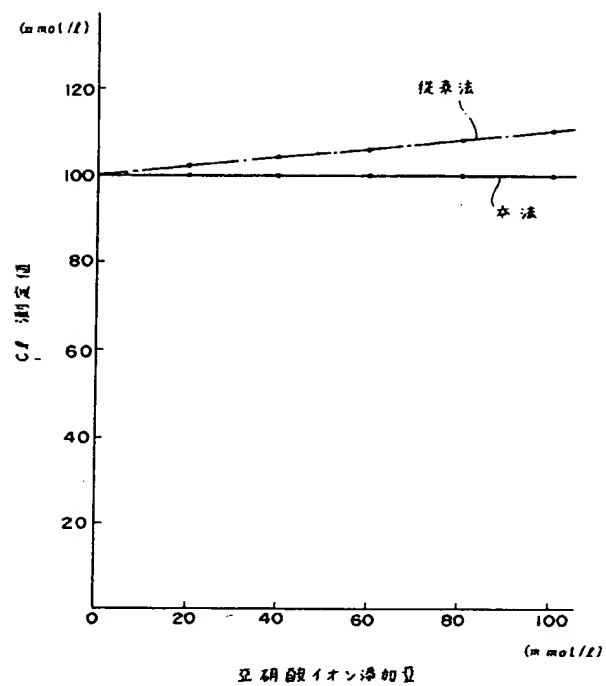
第 1 図



第 2 図



第 3 図



L13 ANSWER 1 OF 1 WPIDS (C) 2003 THOMSON DERWENT

AN 1989-221677 [31] WPIDS

DNN N1989-169148 DNC C1989-098429

TI Assaying chloride ion in body fluid treated to eliminate nitrite - to activate inactive amylase then colorimetric measurement of enzyme, opt. using nitrate also.

DC B04 D16 J04 S03

IN MITSUMAKI, H; TAKAHATA, F; TAKASE, J

PA (HITA) HITACHI LTD

CYC 4

PI DE 3900755 A 19890727 (198931)\* 9p <--

JP 01181799 A 19890719 (198935)

DE 3900755 C 19920326 (199213) 9p <--

JP 06006078 B2 19940126 (199407)

ADT DE 3900755 A DE 1989-3900755 19890112; JP 01181799 A JP 1988-5495 19880113; DE 3900755 C DE 1989-3900755 19890112; JP 06006078 B2 JP 1988-5495 19880113

FDT JP 06006078 B2 Based on JP 01181799

PRAI JP 1988-5495 19880113

AB DE 3900755 A UPAB: 19930923

Quantitative determination of chloride ions comprises (1) treating the test sample with a reagent (A) which decomposes nitrite (and opt. also nitrate) ions; (2) treating the sample with inactive amylase (IAM), a Ca-ion contg. complex cpd. (B) and a complex-forming reagent (C) which can react with Ca to form a complex, then (3) measuring the amt. of active amylase (AAM) formed by the action of chloride ions on IAM, and from this deriving the amt. of chloride.

Also new is a test kit for this process.

USE/ADVANTAGE - The method provides a highly accurate assay of chloride ion in biological fluid and is not subject to interference from other ions.

1/3

=>

F<sub>16</sub>, 1, 15, 16

PTO 03-3334

Japanese Kokai Patent Application  
No. Hei 1[1989]-181799

9/88 7628

REAGENT FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF CHLORIDE

Junko Takase et al.

---

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE  
WASHINGTON, D.C. MAY 2003  
TRANSLATED BY THE RALPH MCELROY TRANSLATION COMPANY

JAPANESE PATENT OFFICE  
PATENT JOURNAL (A)  
KOKAI PATENT APPLICATION NO. HEI 1[1989]-181799

Int. Cl. <sup>4</sup> :	C 12 Q 1/40
Sequence No. for Office Use:	6807-48
Filing No.:	Sho 63[1988]-5495
Filing Date:	January 13, 1988
Publication Date:	July 19, 1989
No. of Claims:	4 (Total of 5 pages)
Examination Request:	Not filed

REAGENT FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF CHLORIDE

[Enso ion teiryō yō shiyaku]

Inventors:	Junko Takase et al.
Applicant:	Hitachi, Ltd.

[There are no amendments to this patent.]

Claims

1. A type of reagent for quantitative determination of chloride characterized by the fact that the reagent for quantitative determination of chloride has a complex forming reagent that forms a complex with calcium ions, amylase, and calcium ions, and it also contains a reagent for decomposing nitrite ions and nitrate ions.

2. The reagent for quantitative determination of chloride described in Claim 1 characterized by the fact that said reagent for decomposing nitrite ions and nitrate ions is nitrate reductase and nitrite reductase.

3. The reagent for quantitative determination of chloride described in Claim 1 characterized by the fact that said complex forming reagent is EDTA.



4. The reagent for quantitative determination of chloride described in any of Claims 1-3 characterized by the fact that said amylase is  $\alpha$ -amylase derived from mammals.

#### Detailed explanation of the invention

##### Industrial application field

This invention pertains to a type of reagent for quantitative determination of chloride using an enzyme method. In particular, this invention pertains to a type of reagent for quantitative determination of chloride that can avoid influences from coexisting interference ions.

##### Prior art

At present, electric quantity titration method and electrode method are often used for quantitative determination of ions in bio samples, such as serum, urine, marrow liquid, etc. However, the electric quantity titration method is hard to incorporate into a biochemical automatic analysis device. The electrode method has a problem with respect to ion specificity. In consideration of these problems, the following enzyme method has been proposed.

As described in Eur. J. Biochem, 41, pp. 171-180 (1974), in an enzyme method, the property that the affinity between amylase derived from mammals and calcium ions depends on chloride is exploited. The principle for measurement of chloride according to the enzyme method is as follows.

When  $\alpha$ -amylase of a pig pancreas is combined with a complex forming reagent (calcium chelator), which can form a complex with ethylenediamine tetracetate (EDTA) or the like, and a minute amount of calcium ions in the absence of chloride, the  $\alpha$ -amylase of the pig pancreas releases intra-molecular calcium ions, and it is changed to inactive  $\alpha$ -amylase. In this state, when serum or another sample is added, depending on the calcium ion concentration in the sample, the inactive amylase recombines with calcium ions and changes to the active type. The active  $\alpha$ -amylase after this change is measured using an  $\alpha$ -amylase activity measurement reagent, and the result is converted to chloride concentration.

This enzyme method has a higher ion specificity than the electrode method, and it is a measurement method that can also be applied to biochemical automatic analysis devices. Table 1 in the following lists the ion specificity of the electrode method and enzyme method with sensitivity for chloride taken as 100%.

Table 1

	Enzyme method	Electrode method
$\text{Cl}^{\text{E}}$	100	100
$\text{NO}_2^{\text{E}}$	10.3	—
$\text{NO}_3^{\text{E}}$	9.8	140

As can be seen from Table 1, the enzyme method has a higher ion specificity than the electrode method.

#### Problems to be solved by the invention

However, for the aforementioned conventional enzyme method, there are still some problems. That is, with no measure taken to avoid the influence of nitrite ions and nitrate ions, there is problem with respect to selectivity. After extensive studies by the present inventors, it was found that when nitrite ions and nitrate ions are present, the ion specificity degrades. That is, as can be seen from Table 1, the value is 10.3% for nitrite ions, and it is 9.8% for nitrate ions. No measure is taken to avoid influences from these ions.

The objective of this invention is to solve the aforementioned problems of the prior art by providing a type of reagent for quantitative determination of chloride characterized by the fact that it can avoid influences from nitrate ions and nitrite ions, and it has a high ion specificity.

#### Means to solve the problem

In order to realize the aforementioned objective, this invention provides a type of reagent for quantitative determination of chloride characterized by the fact that the reagent for quantitative determination of chloride has a complex forming reagent that forms a complex with calcium ions, amylase, and calcium ions, and it also contains a reagent for decomposing nitrite ions and nitrate ions.

According to this invention, examples of complex forming reagents that can be used for forming complex with calcium ions include ethylenediamine tetracetate, trans-1,2-cyclohexanediamine-N,N,N',N'-tetracetate, glucose ether diamine tetracetate, imino tetracetic acid, diaminopropane tetracetic acid, etc.

Also, conventional reagents commonly used in conventional  $\alpha$ -amylase activity measurement methods may be used as reagents for measurement of the activity of amylase.

Examples include 4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-maltopentaoside, 2-chloro-4-nitrophenyl- $\beta$ -D-maltopentaoside, 2-chloro-4-nitrophenyl- $\beta$ -D-maltoheptaoside, etc.

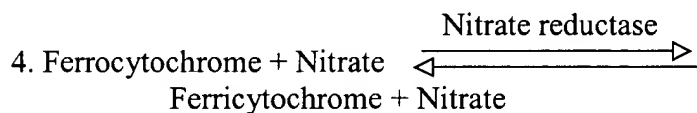
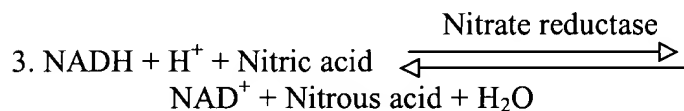
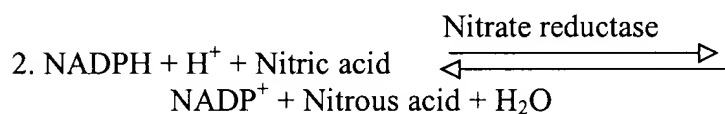
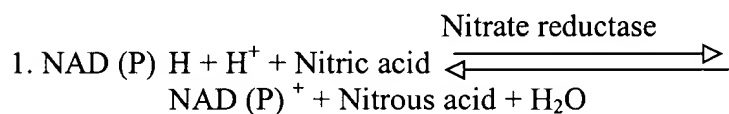
Various types of amylase may be used, such as  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, etc.

Also, according to this invention, as substances that decompose nitrate ions and nitrite ions, one may use nitrate reductase, nitrite reductase, and other enzymes. In addition, one may also use various inorganic and organic decomposing substances. When enzyme is used to decompose nitrite ions and nitrate ions, there is substrate specificity, and there is no influence on other ions. This is an advantage.

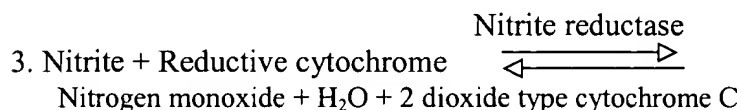
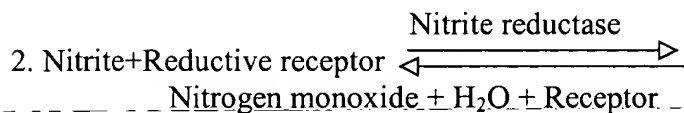
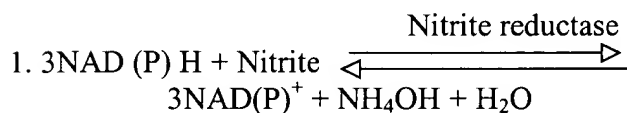
#### Application examples

As an application example of this invention, in a sample solution, nitrate ions and nitrite ions contained in, say, a serum sample, are decomposed by means of enzymes. Nitrate reductase is for decomposing nitrate ions, and nitrite reductase is for decomposition of nitrite ions.

The enzyme reactions between nitrate reductase and nitric acid are as follows:



On the other hand, reactions between nitrite reductase and nitrous acid are as follows:



In this application example, the aforementioned enzyme reactions can be used to decompose nitrite ions and nitrate ions.

In the following, explanation will be provided for specific compositions of the reagent for quantitative determination of chloride in this invention.

In this example, in order to decompose nitrate ions and nitrite ions as interference components in the quantitative determination of chloride, one uses nitrate reductase, nitrite reductase and NAD(P)H. Also,  $\alpha$ -amylase measurement reagents, one may also use  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glycosidase, and 2-chloro-4-nitrophenyl- $\beta$ -D-maltoheptaoxide. The reagent is composed of a first reagent and a second reagent.

#### (1) First reagent

The first reagent has the following composition.

15 mg of calcium ethylenediamine tetracetate and 1.1 g of di-sodium ethylenediamine tetracetate were added into 100 mL of 0.1M phosphate buffer, followed by adjusting the pH to 7.0 using a 5% aqueous solution of sodium hydroxide. This solution is taken as solution A. Then, 11K units (U) of  $\alpha$ -glucosidase, 300 U of  $\beta$ -glucosidase, 2K U of  $\alpha$ -amylase of pig pancreas, 200 U of nitrate reductase, 200 U of nitrite reductase, and 0.6 mM of NAD(P)H were added to form the first reagent.

#### (2) Second reagent

The composition of the second reagent is as follows.

1.0 g of 2-chloro-4-nitrophenyl- $\beta$ -D-maltoheptaoxide was dissolved in 100 mL of solution A as explained in said section of the first reagent to form a second reagent.

In the following, explanation will be provided for measurement of chloride.

#### (3) Calibration

As standard solutions, saline solutions of 0, 40, 80, 120, 160 and 200 mM were prepared. In 6  $\mu$ L of each saline solution, 320  $\mu$ L of the first reagent and 80  $\mu$ L of the second reagent were added. Then, at 37°C, the increase in the light absorptivity over time at 37°C and at a principal wavelength of 405 nm and a secondary wavelength of 480 nm was measured on a Hitachi 7150 Model Automatic Analysis Device for calibration.

The increase in the light absorptivity over time is proportional to the concentration of — — — — — chloride.

Figure 1 is a diagram illustrating the operation procedure of the automatic analysis device.

In this application example, the measurement of chloride using the reagent of this invention is carried out in a process illustrated in Figure 1.

As shown in Figure 1, after sample dispensing, the first reagent was added, followed by agitation for reaction within a few minutes. Then, the second reagent was added, followed by agitation for further reaction. In the period from addition of the first reagent to the end of the measurement, the light absorptivity of the reaction solution was measured at intervals of ten seconds, and, using the light absorptivity at the timing corresponding to the analysis method, the chloride was quantitatively determined.

#### (4) Influence of addition of nitrate ions

A solution prepared by adding sodium nitrate into the control serum was used as the sample. The control serum was dissolved using distilled water in half the assigned amount. This is taken as solution B. 1.7 g of sodium nitrate were dissolved in 100 mL of distilled water to adjust to 200 mM nitrate. This is taken as solution C. Solution C was diluted appropriately to form 40, 80, 120, 160, and 200 mM sodium nitrate solutions. Each solution was mixed with solution B at a ratio of 1:1. In this case, the results of the quantitative determination of chloride are shown in Figure 2 together with the quantitative determination results for a conventional reagent (from the first reagent in (1), nitrate reductase, nitrite reductase, and NAD(P)H were removed, and the second reagent is the same as that in (2)). As shown in Figure 2, in the prior art, when the concentration of nitrate ions is increased, the result of a quantitative determination of chloride also becomes higher. On the other hand, when the method of this invention is adopted, the influence of nitrate ions can be removed completely.

#### (5) Influence of addition of nitrite ions

0.38 g of sodium nitrite was dissolved in 100 mL of distilled water to prepare a 200 mM solution of nitrite ions. The sample was prepared in the same way as in (4), and chloride was quantitatively determined using this method and the conventional method, respectively. The results are shown in Figure 3. Just as in (4), this method can completely prevent an influence from nitrite ions.

The concentration of chloride that can be determined quantitatively using the reagent for quantitative determination of chloride of this invention is in the range of about 10-3,000 mM. This concentration range can effectively ensure the conventional range of measurement of chloride in serum samples (70-130 mM). The reagent of this invention can effectively enable the quantitative determination of chloride in blood.

The tolerable concentration ranges of the various components in the reagent for quantitative determination of chloride in this invention are as follows.

For the first reagent, the ranges are as follows.

For  $\alpha$ -glucosidase: 80-110 kU/L;  $\beta$ -glucosidase: 2.5-3 kU/L;  $\alpha$ -amylase: 2-20 kU/L;  $\text{Ca}^{+}$ : 0.75-1.5 mM/L; EDTA: 30-100 mM/L; phosphate buffer pH 7.0, 0.1 M/L; nitrate reductase: 2-20 kU/L; nitrite reductase: 2-20 kU/L; NAD(P)H: 6-60 mM/L.

For the second reagent, the ranges of contents of components are as follows.

$\text{Ca}^{+}$ : 0.75-1.5 mM/L; EDTA: 3.0-100 mM/L; 2-chloro-4-nitrophenyl- $\beta$ -D-maltoheptaoside: 3.8-7.5 mM/L.

Also, one may use 2.5% maltopentaose in place of 2-chloro-4-nitrophenyl- $\beta$ -D-maltoheptaoside.

#### Effect of the invention

As explained above, according to this invention, it is possible to decompose nitrate ions and nitrite ions. Consequently, it is possible to provide a type of reagent for quantitative determination of chloride with a high ion specificity, with influences of nitrate ions and nitrite ions prevented. Consequently, it is possible to perform quantitative determination for chloride more correctly.

#### Brief description of the figures

Figure 1 is a diagram illustrating the measurement process of an automatic analysis device. Figure 2 is a graph illustrating the influence on chloride by adding nitrate ions. Figure 3 is a graph illustrating influence of addition of nitrite ions on the measurement value of chloride.

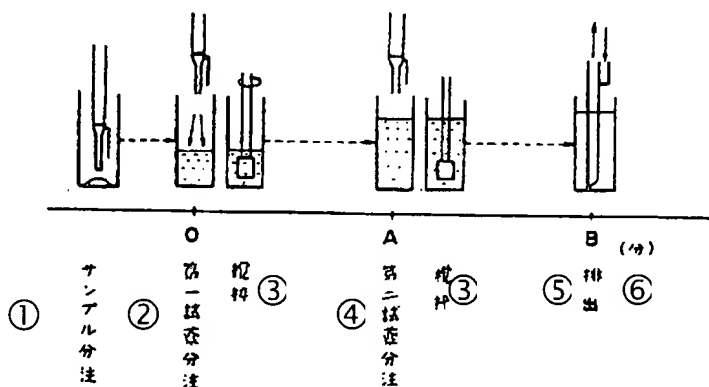


Figure 1

- Key: — 1 — — Dispensing of sample  
 2 Dispensing of first reagent  
 3 Agitation  
 4 Dispensing of second reagent  
 5 Discharge

6 (Min)

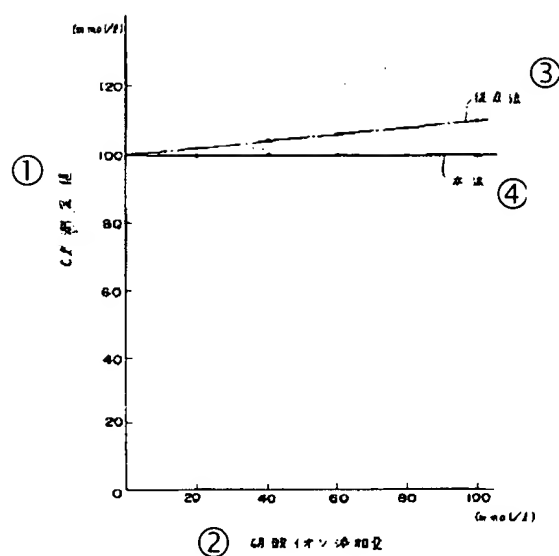


Figure 2

Key: 1 Measurement value of Cl  
 2 Amount of nitrate ions added  
 3 Prior art  
 4 Method of this invention

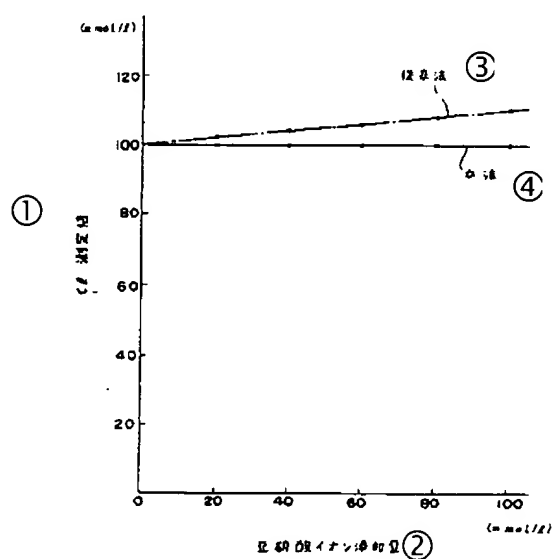


Figure 3

Key: 1 Measurement value of Cl  
 2 Amount of nitrite ions added  
 3 Prior art  
 4 Method of this invention